

小胞体エステラーゼ AADAC を用いた新たな動脈硬化・糖尿病合併症治療の開発

豊原敬文

東北大学 医工学研究科

【研究の背景】

申請者は重篤な心血管疾患を有する糖尿病患者と有さない糖尿病患者由来の iPS 細胞から血管平滑筋細胞を分化誘導して遺伝子発現を比較することによって

- 1) 心血管疾患に罹患“しにくい”糖尿病患者の血管平滑筋では小胞体エステラーゼである Arylacetamide Deacetylase (AADAC) の発現が上昇していること、
- 2) AADAC は血管平滑筋細胞に蓄積する Triacylglycerol (TAG) などの貯蔵脂肪を Kennedy 経路を介してリン脂質へ変換することで動脈硬化に対して抑制的に働くこと(図 1)、
- 3) 血管平滑筋特異的に AADAC を強制発現した動脈硬化発症マウスでは血管の動脈硬化の著明な改善が認められたことから局所酵素機能を介した新たな動脈硬化抑制のメカニズムを解明した(図 2、Cell Stem Cell 2020)。



上記知見は一つの小胞体内エステラーゼ (AADAC) の調節で病態が改善することを示している

【目 的】

AADAC は血管平滑筋の脂肪蓄積、脂肪毒性を是正して動脈硬化に抑制的に働くことから、本研究ではこの知見を発展させて、AADAC の全身臓器における役割を明らかとし、脂肪毒性軽減効果や脂質代謝変化について検討を進める。

また、今後 AADAC を利用した新たな治療を開発するため AADAC の転写調節領域の解明を行うことを目的とした。

【方 法】

本研究計画では AADAC を用いた新たな治療法の開発を目指し、全身臓器の脂肪毒性に対する AADAC の役割の解明、転写調整メカニズムの解析を行うために下記 2 つの計画を予定した。

計画 1) 全身臓器の脂肪毒性に対する AADAC の役割と治療効果の検討

申請者は Cre 依存的に AADAC を強制発現あるいはノックアウトできる遺伝子改変マウスを有している。特に血管平滑筋特異的強制発現、ノックアウトマウスは使用できる状態にあり、まずは血管平滑筋特異的 AADAC 発現調節マウスで血糖などの評価を行う。また同時に AADAC 強制発現(TG)/ノックアウトマウスを ROSA26-CreERT2 マウスと交配させ tamoxifen 依存的に全身組織に AADAC を発現/ノックアウトし、さらに高脂肪食を負荷する事で糖尿病状態下での

AADAC の全身臓器における役割を検討する準備を進める。

計画 2) AADAC の転写調節に関わるプロモーター、エンハンサーを探索し創薬の可能性を検討する

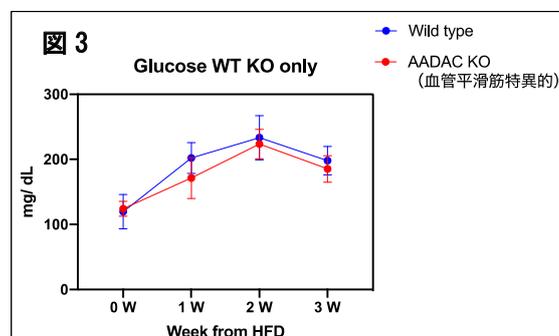
AADAC の転写調節領域にはメチル化、アセチル化の指標である H3K4Me1、H3K4Me3、H3K27Ac で示される複数のピークとして promoter、enhancer 候補が認められ、そのうちのいくつかは AADAC の promoter や enhancer としての可能性が挙げられている。

Promoter や Enhancer 領域の活性化を人工的に生じさせる方法として Cas9 蛋白質の切断能を不活性化して (deactivated Cas9:dCas9) 転写調節因子 (p300 や VPR) を接続した改変蛋白質を利用する CRISPR-dCas activation システムが知られている。この方法を用いて promoter、enhancer 候補配列部位に gRNA をデザインし、promoter や enhancer を活性化する CRISPR-dCas activation 蛋白質をその部位に誘導し AADAC の発現を観察することによって、実際にその promoter や enhancer 候補配列が promoter や enhancer として働いているかどうかを検証できるように準備を行う。

【結 果】

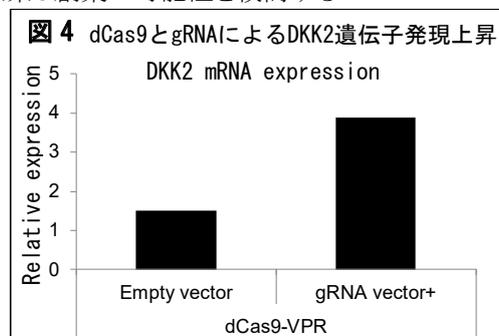
計画 1) 全身臓器の脂肪毒性に対する AADAC の役割と治療効果の検討

AADAC TG マウスと AADAC ノックアウトマウスを ROSA26-CreERT2 マウスと交配させ産子を得た。コロナ下で ROSA26-CreERT2 の入手が遅くなってしまった影響があったが、現在 Tamoxifen の投与を行う準備が整った。一方で先行して血管平滑筋特異的 AADAC ノックアウトマウスに高脂肪食を与え血糖値の推移を検討したが、血管平滑筋でのみ AADAC を投与したマウスでは血糖値の変化は認められなかった(図 3)。今後全身 AADAC 全身強制発現/ノックアウトマウスで検討を行うとともに OGTT などの負荷試験を施行予定である。



計画 2) AADAC の転写調節に関わるプロモーター、エンハンサーを探索し創薬の可能性を検討する

データベースで推定される Promoter、Enhancer 領域への gRNA のデザインを行った。deactivated Cas9 の系が実際に使用可能を検証するために DKK2 遺伝子の Promoter 領域に gRNA をデザインして transfection を行ったところ DKK2 遺伝子の上昇が確認された。さらに AADAC 周辺領域の遺伝子発現を確認したところ、糖尿病患者 iPS 細胞由来血管平滑筋では約 5kb 離れたところに存在する linc RNA である RP11-64D22.5 が非常に類似した発現パターンを示すことも明らかになった。これらのデータを元に deactivated Cas9 を用いた AADAC の Promoter および Enhancer 領域の探索を今後も継続して行う予定である。



【考 察】

AADAC は血管平滑筋に局所的に発現変化があった場合には動脈硬化の改善などの作用はあるが、全身の血糖や脂質に与える影響は認められなかった。全身発現/ノックアウトマウスを今後用いることでさらに他の臓器における役割を解明していくが、AADAC は血糖や脂質などの全身代謝に影響を及ぼすというよりは局所の脂質代謝に関与して各臓器での病態に関わっている可能性も考えられた。

このため、ますます AADAC の臓器特異的な発現調節は重要であると考えられた。AADAC の Promoter 領域、Enhancer 領域の探索は準備が整ったため、今後もさらに解析を進めていくが、Genehancer でもそこまで遠い距離に Promoter や Enhancer が想定されているわけではなく、50kb 先にある lincRNA も非常に類似した発現パターンをとることから調節領域を絞り込める可能性もある。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

AADAC を全身に発現させた場合に局所あるいは全身的に脂質毒性軽減効果が確認できれば、AADAC を用いた新たな治療法の開発につながる。これまで血清脂質を調節するスタチンのような薬剤の開発は進められてきたが、細胞内脂質代謝に着目した薬剤はこれまでに確立されておらず、画期的な治療になる可能性がある。また転写調節領域の解析は AADAC をターゲットとした薬剤の開発を容易にするとともに、臓器特異的な効能を有する薬剤の開発にとって一助となる可能性もある。

【参考・引用文献】

Toyohara T., Roudnicky F., Florido M.H.C., Nakano T., Yu H., Katsuki S., Lee M.J., Torsten M., Friesen M., Davidow L.S., Ptaszek L., Abe T., Rubin L.L., Pereira A.C., Aikawa M., Cowan C.A. Patient hiPSCs Identify Vascular Smooth Muscle Arylacetamide Deacetylase as Protective against Atherosclerosis. *Cell Stem Cell* 27: 147-157, 2020.

Li K., Liu Y., Cao H., Zhang Y., Gu Z., Liu X., Yu A., Kaphle P., Dickerson K.E., Ni M., Xu J. Interrogation of enhancer function by enhancer-targeting CRISPR epigenetic editing. *Nat. Commun.* 11: 485, 2020